

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
 - **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
 - **FADED TEXT**
 - **ILLEGIBLE TEXT**
 - **SKEWED/SLANTED IMAGES**
 - **COLORED PHOTOS**
 - **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
 - **GRAY SCALE DOCUMENTS**
-

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Requested Patent: JP63107997A

Title: PEPTIDE ;

Abstracted Patent: JP63107997 ;

Publication Date: 1988-05-12 ;

Inventor(s): SHIBUI TATSURO; others: 05 ;

Applicant(s): MITSUBISHI CHEM IND LTD ;

Application Number: JP19860220835 19860918 ;

Priority Number(s): ;

IPC Classification: C07K13/00 ; A61K37/02 ; C12N15/00 ; C12P21/02 ;

Equivalents:

ABSTRACT:

NEW MATERIAL:The peptide having an amino acid sequence of formula and produced by microbiological means. **USE:**A hypotensor. **PREPARATION:**For example, a piece of human heart is homogenized in the presence of guanidium thiocyanate. Whole RNA is separated from the homogenate by CsCl equilibrium density gradient ultracentrifugation and purified by oligo(dT)cellulose column chromatography to obtain mRNA. The mRNA is treated with a transcriptase in the presence of a vector primer and the obtained cDNA is digested with a restriction enzyme and cyclized with a linker to obtain a plasmid containing the cDNA fragment. E.coli is transformed by the insertion of the plasmid to obtain a cDNA library. The cDNA library is screened by using a probe consisting of a nucleotide complementary to DNA coding cardionatrin. The objective peptide of formula can be produced from a clone hybridizing with the probe.

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-107997

⑬ Int.Cl.⁴C 07 K 13/00
A 61 K 37/02
C 12 N 15/00

識別記号

ABU

庁内整理番号

8318-4H

8615-4C

8412-4B ※審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月12日

⑮ 発明の名称 ペプチド

⑯ 特 願 昭61-220835

⑰ 出 願 昭61(1986)9月18日

⑱ 発 明 者 浜 井 達 郎 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内⑲ 発 明 者 内 田 み ち る 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内⑳ 発 明 者 三 國 俊 亮 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内㉑ 発 明 者 佐 藤 睦 美 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内

㉒ 出 願 人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉓ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明 細 書

..... (I)

1 発明の名称 ペプチド

2 特許請求の範囲

(i) 下記式(I)のアミノ酸配列を有し、微生物学的に製造されたペプチド。

Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn
 Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu
 Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro
 Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Glu
 Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala
 Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu
 Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser
 Pro Ala Glu Arg Asp Gly Gly Ala Leu
 Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp
 Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu
 Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser
 Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly
 Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Glu Ser
 Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、血圧降下作用等を有するペプチドに関する。

(従来の技術)

心房性ナトリウム利尿ペプチドについては最近、種々の報告がなされており、その一つとしてヒト心房よりヒヨコ直腸の弛緩作用を指標として分子量約13,000で、126個のアミノ酸からなるr-hANP (human atrial natriuretic polypeptide)が見出されている(例えば、代謝 vol.22, 頁6, 5/5頁, 1985年)。

(発明が解決しようとする問題点)

そして、遺伝子組み換えの方法によつて、このr-hANPを得ることが検討されているが、成熟型のものを得るにはいたっていない。

本発明者は先にアミノ酸残基数73よりなり、血圧降下作用を有するヒトアトリアルペプチドラテン(AVD) (Atrial vasodilator)、さ

明細書の浄書(内容に変更なし)

Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu
 Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser
 Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly
 Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser
 Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

.....(I)

らにはこれのアナログを見出したか、(特開昭
 61-8506号公報参照。)これらの前駆体
 として成熟型 r-hANP を得るべくさらに検討
 を加え、その DNA フラグメントを特定しこれ
 を用いて、微生物学的に蛋白を産生することに
 より本発明に到達した。

(問題点を解決するための手段)

すなわち、本発明の要旨は、下記式(I)で示
 される126個のアミノ酸からなるアミノ酸配
 列を有し、微生物的に製造された r-hANP ペ
 プチドにある。

Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn
 Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu
 Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro
 Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln
 Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala
 Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu
 Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser
 Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu
 Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp

明細書の浄書(内容に変更なし)

この mRNA 原料より、岡山とバーグ(Berg)の
 方法(モレキュラー アンド セルラー バイオ
 ロジー (Molecular and Cellular Biology) 2,
 161-170, 1982) によつて、cDNA ライブ
 ラリーを得る。すなわち、pBR322とSV40
 のハイブリッドプラスミドを用いて、ベクター
 プライマーとオリゴ(dG) テールリンカーを得
 る。このベクタープライマーと上記 mRNA 共
 存下に逆転写酵素を作用させて cDNA を合成
 し、その後制限酵素 Hind III で消化し、ついで
 上記リンカーを用いて環化させる。その後、
 mRNA 部分を DNA で置換して、cDNA フ
 ラグメント含有プラスミドを得る。

ついで、常法により、これを用いて大腸菌
 (*Escherichia coli*) 等をアンピシリン耐性に
 形質転換して、cDNA ライブラリーを得る。

ついで、カルデイオナトリン [Ser-Leu-Arg

5
 -Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp
 10
 15
 -Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係るペプチドは、たとえば以下の方
 法により微生物学的に製造しうる。

まず、本発明において用いられる r-hANP
 様ペプチドをコードする DNA 配列を含有する
 DNA フラグメントの調製方法の一例を示す。

ヒト心臓断片をグアジニルチオンアネートと
 ともにホモジナイズし、CaCl₂ 平衡密度勾配超
 遠心によつて全 RNA を分離する(チャーグウィ
 ン (Chirgwin) ら、バイオケミストリー (Bio-
 chemistry) 18, 5294-5299, 1979)。

ついで、常法によりこれをオリゴ(dT) セルロ
 ースカラムクロマトグラフィーで精製し、ポリ(A)
 含有 RNA を単離する (mRNA 原料)。

明細書の浄書(内容に変更なし)

25
 -Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr : (ヒット) の Met
 -Asp-Arg-Ile-Gly をコードする DNA 配列に
 相補性の下記ヌクレオチドをプローブとして合
 成する。

3'-TAC CTA GCA TAA CC-5' (オリゴ I)
 G
 C
 T
 TCT

3'-TAC CTG GCA TAA CC-5' (オリゴ II)
 G
 C
 T
 TCT

このプローブを用いて、上述の cDNA ライ
 ブラリーをスクリーニングし同プローブとハイ
 ブリダイズするクローンを選択する。そのクロー
 ンより得られる cDNA フラグメントはマキ
 サムーギルバード法(メソツズ イン エンザイ
 モロジー (Methods in Enzymology) 63, 497-
 560, 1980) によつて塩基配列を決定する。

上記 cDNA フラグメントは必ずしも一定の

明細書の添付(内容に変更なし)

ヌクレオチド配列及びヌクレオチド残基数を有することを要求されずDNAによつてコードされる物質がr-hANPと同様の生理活性を有するr-hANP様物質であれば、ヌクレオチド配列の一部が置換もしくは^前削除されあるいはヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列であつてもよい。

得られるcDNAフラグメントの塩基配列の部分コードの一例を下記式(II)に示す。

Asn	Pro	Met	Tyr	Asn	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Asp	GAC	CTG	ATG	CAT	TTC	AAG	Lys
AAT	CCC	ATG	TAC	AAT	CCC	GTG	TCC	AAC	GCA	GAC	CTG	ATG	CAT	TTC	AAG	Lys	
Asn	Leu	Leu	Asp	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Met	Pro	Leu	Glu	Asp	Glu	Val	Val	
AAT	TTG	CTG	GAC	CAT	TTG	GAA	GAA	AAG	ATG	CCT	TTA	GAA	CAT	GAG	GTC	Val	
Val	Pro	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	
GTG	CCC	CCA	CAA	GTG	CTC	AGT	GAG	CCG	AAT	GAA	GAA	GCG	GUG	GCT	GCT	Ala	
Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Tyr	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Pro	
CTC	AGC	CCC	CTC	CCT	GAG	GTG	CCT	CCC	TGG	ACC	GGG	GAA	GTC	AGC	CCA	Pro	
Ala	Gln	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	(D)						
GCC	CAG	AGA	GAT	GGA	GCT	GCC	CTC	GCG	CGG								

次に、このDNAフラグメントを用いて、発現に好適なプラスミドを構築する一態様について、さらに図面により説明する。すなわち、プラスミドpHANF 48 (Nature 310, 23, 669 '84)により得られるr-hANPを含む301 bp フラグメントと、メチオニンリンカーを結合させた後、制限酵素Hind IIIで消化し、333 bp フラグメントを得る。これと図1に示すリボソーム結合配列(RBS)を持つリンカーとを結合し、制限酵素BamH Iで消化し、図3に示す365 bp フラグメントを得る。これをプラスミドpUC8 (P.L Biochemicals より購入)のBamH I部位に導入し、大腸菌を形質転換して、プラスミドpUCd8 (図3)を得る。

ついでこのpUCd8を制限酵素Ava Iで部分消化し、ターミネーション((Term) TGATAG ACTATC)リンカーを挿入し、プラスミドpUCd8 Termを得る(図4)。

また、Tacプロモーターを有するプラスミドpDR540 (P.L Biochemicals より購入)を

EcoRI、BamH Iで消化し、約370 bp フラグメントを、一方、上記プラスミドpUCd8 TermをApa I、BamH Iで消化し、260 bp フラグメントを得る。

一方pHANF 48のEcoRI、Apa I 消化後の大きい断片を得る。この三者を連結し、大腸菌を形質転換して目的とするプラスミドpHAVD (図6)を得る。

プラスミドpHF006 (Nucleic Acid Research 10, 6957 (1982))より得られる178 bpのPst I断片とpSP64 (Boehringer Mannheim 社製)をPst Iで消化し、ついでBAP処理したものを結合しpSP64・OmpFを得る。(図7) pSP64・OmpFをHind IIIで消化し、Bcl IIで消化した後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化しHind III リンカーを挿入してpSP64・633を得る。(図7)

得られるpSP64・OmpF 633をPst Iで消化しT4ポリメラーゼで平滑化させ、Hpa I リンカーを挿入し、pSP64・OmpF・Hpa Iを得る。

(図8)このプラスミド pSP64-OmpF-RpaI を EcoRI、HindIII で消化し約 300 bp の断片を得る。さらに HhaI で消化し OmpF のシグナルペプチド領域を含む 85 bp の断片を得る。この断片に合成リンカー



を連結し、pUC8 を EcoRI、HindIII で消化したものに挿入してプラスミド pUC-OmpF-S+Met を得る。(図8)得られる pUC-OmpF-S+Met を HindIII、PvuII で消化して OmpF シグナルペプチド領域を含む 70 bp の断片と、pHANF48 より得られる AVD 遺伝子領域を含む 269 bp をさらに ApaI で消化した約 220 bp の断片を連結したものを、pBAVD を HindIII、ApaI で消化して得られる大きい方の断片に結合してプラスミド pBAVD-ΔST を得る。このプラスミドを AvaI で消化して得られる大きい方の断片とプラスミド pBAVD を AvaI で消化して得られる小さい方の断片を

連結しプラスミド pBAVD-ΔP を得る。(図9)これを HindIII で消化し、BAP 処理し、プラスミド pBAVD を HindIII で消化して得られる lac プロモーター領域を含む 104 bp を挿入し、プラスミド pBAVD を得る。(図9)さらにこのプラスミドを EcoRI で消化し、BAP 処理し、プラスミド pMC9 を EcoRI で消化して得られる lac I 遺伝子を含む 1.7 kbp の断片を挿入し pBAVD-lac I を得る。

pHANF48 を AatII、AvaI で消化し、BAP 処理して得られる大きい断片とプラスミド pBAVD-lac I を AatII、AvaI で消化して得られる Omp-AVD 遺伝子を含む断片を連結し、pBANF を得る。(図11)

ついで、このプラスミド pBANF を宿主に導入し、形質転換された宿主を常法により培養することにより、目的とする蛋白を得ることができ。

宿主としては、大腸菌、酵母菌等の微生物のほか、動物細胞を用いることもできる。

明細書の存続(内容に変更なし)

得られる蛋白(γ-HANP ペプチド)は、上配式(I)で示されるアミノ酸配列を有し、血管弛緩作用(血圧降下作用)等を有する。

(実施例)

以下、実施例によりさらに本発明を詳細に説明する。

なお、実施例中、制限酵素、修飾酵素等の処理は、これらの試薬の製造・販売者(宝酒造株式会社、New England Biolabs)の指示書にしたがって行なつた。

参考例1

<原料 DNA フラグメントの調製>

(1) ヒト心臓断片を液体窒素で破碎した後グアニジウムチオシアネート水溶液を添加しホモジナイズした。得られたホモジネートを、チャークウィン(Chirgwin)らの方法(Biochemistry)18, 5294-5299, (1979)にしたがつて、塩化セシウム平衡密度勾配超速心によつて全 RNA を分離した。ついで、常法によりこれをオリゴ

明細書の存続(内容に変更なし)

(dT) セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し、ポリ(A)含有 RNA を単離し、mRNA 原料とした。

(2) 一方、岡山と Berg の方法(Molecular and Cellular Biology)2, 161-170, (1982)により、pBR322 と 8V40 のハイブリッドプラスミドを用いて、ベクタープライスマーとオリゴ(dG) テールリンカーを得た。

すなわち、pBR322 と 8V40 (マップユニット 0.71-0.86) のハイブリッドプラスミド 400 μg を、ウシ血漿アルブミンを含む緩衝液中で制限酵素 KpnI で 37℃、4 時間消化させた。

ついで、常法によりエタノール沈殿によつて DNA を回収し、これを dTTP を含む緩衝液に溶解し、ターミナルデオキシスクレオチジルトランスフェラーゼを添加して、37℃で 30 分間反応させて、制限酵素 KpnI の消化部位に約 60 個の dT テールを付加させ

明細書の浄書(内容に変更なし)

た後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。ついで、このDNAをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素 Hpa I により消化した(37℃、5時間)。大きい方のDNAフラグメントを、アガロースゲル電気泳動により精製し、ガラスパウダー法(ボーグステイン(Vogelstein)ら、プロシーディングオブザナショナルアカデミーオブサイエンスオブザユーエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.)

76, 615-619, 1979) によつて回収した。その後、このDNAを0℃でオリゴ(dA)セルロースカラムに付し、水で溶出させた後、エタノールで回収し、オリゴ(dT)テールを有するベクタープライマーを得た。

他方、pBR322とSV40(マツブユニット0.19~0.32)とのハイブリッドプラスミド100μgをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素 Pst I により消化した(37℃、1時間半)。ついで、DNAを回

明細書の浄書(内容に変更なし)

り、20分間反応させ、プラスミド-cDNA:mRNAを合成し、これをエタノール沈殿しベレット状で回収した。このベレットをCoCl₂、ジチオスレイトール、ポリ(A)、(³²P)dCTP及びターミナルデオキシヌク

明細書の浄書(内容に変更なし)

レオチジルトランスフェラーゼを含む緩衝液に溶解し、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを添加して、37℃で20分間反応させ、約10~15のdGテールを付加させた。回収したDNAを、ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で制限酵素 Hind III により消化させ(37℃、1時間)、ついでアガロースゲル(18%)電気泳動に付し、小さいオリゴ(dG)テールリンカーDNAを抽出、回収した。

(3) 岡山とBergの方法(モレキュラーアンドセルラーバイオロジー(Molecular and Cellular Biology) 2, 161-170, 1982)により、cDNAライブラリーを得た。

すなわち、Tris-HCl(pH 8.3)、HgCl₂、KCl、ジチオスレイトール、dATP、dTTP、dGTP及び(³²P)dCTPを含む水溶液に上記(1)で得られたmRNA30μgと上記(2)で得られたベクタープライマー10μgを添加して、逆転写酵素の存在下に37

℃で、20分間反応させ、プラスミド-cDNA:mRNAを合成し、これをエタノール沈殿しベレット状で回収した。このベレットをCoCl₂、ジチオスレイトール、ポリ(A)、(³²P)dCTP及びターミナルデオキシヌク

レオチジルトランスフェラーゼを含有する緩衝液に溶解し、37℃、10分間反応させ、末端あたりdCMPの10~15の残基を付加させた。ついで、回収したオリゴ(dC)テールプラスミド-cDNA:mRNAを含有するベレットをウシ血清アルブミンを含む緩衝液に溶解し、制限酵素 Hind III で37℃、1時間消化し、エタノール沈殿により、Hind III 消化オリゴ(dC)テール-cDNA:mRNAプラスミドを回収した。

これを前記(2)で得られたオリゴ(dG)テールリンカーDNAを含む緩衝液に溶解し、65℃、2分間インキュベートし、さらに42℃、30分間保持し、0℃に冷却した。ついで、β-NAD(ニコチンアデニンヌクレチド)存在下、大腸菌(*E. coli*) DNAリガーゼを加えて、一夜インキュベートした。その後、dATP、dTTP、dGTP、dCTP、β-NAD、*E. coli* DNAリガ

明細書の浄書(内容に変更なし)

ーゼ、*E. coli* DNAポリメラーゼ及び
E. coli RNase Hを添加して、この混合物を
 12℃、1時間、次いで室温で1時間インキ
 ュベートした後、冷却し、反応を停止させ目
 的とするcDNAフラグメント含有プラスミ
 ドを得た。

ついで、このプラスミドを用いて常法によ
 り、大腸菌(*E. coli*) HB101を形質転
 換した。

- (4) 一方、カルディオナトリンのMet-Asp-Arg-
 -Ile-GlyをコードするDNA配列に相補性
 のヌクレオチドを2つのグループとして合成
 した。

3'-TAC CTA GCA TAA CC-5' (オリゴI)
 G G
 C T
 T
 TCT
 C

3'-TAC CTG GCA TAA CC-5' (オリゴII)
 G G
 C T
 T
 TCT
 C

明細書の浄書(内容に変更なし)

較し、N端側30個のアミノ酸配列においては、
 4箇所相違する。

<プラスミドpHAFVDの調製>

- (i) pHANF48をPvuIIとRsaIで消化し、
 カルディオデイルチンを含む301bpフラ
 グメントを得る。これをメチオニンリンカー
 とT4DNAリカーゼにより結合させ(8℃、
 14時間)、ついで制限酵素HindIIIで消化
 し(37℃、2時間)、333bpフラグメン
 トを得る。このフラグメントと図1に示す
 リボソーム結合配列を有するリンカーとをT
 4DNAリガーゼにより連結し(8℃、14
 時間)、さらに、制限酵素BamHIで消化し
 (37℃、2時間)、図2に示す365bp
 フラグメントを得た。

一方、プラスミドpUC8を制限酵素BamHI
 で消化し(37℃、2時間)、上記365bp
 フラグメントをこのBamHI部位に導入した。
 ついで、大腸菌JM105を形質転換し、Xgal
 上の白コロニーを選択し、プラスミドpUCd8

ついで、このオリゴI、IIをプローブとし

てcDNAライブラリーをスクリーニングし、
 40,000のトランスフォーマントより同プロ
 ーブとハイブリダイズする12個のクローンを
 選択した。この12個のクローンより、cDNA
 フラグメントを抽出し、制限酵素地図を作成し、
 それに基づいて、マキサム-ギルバード法(メソ
 ヅ イン エンザイモロジー (Methods in
 Enzymology) 65,499-560, 1980)によつ
 てフラグメントの塩基配列を決定した
 (pHANF48)。(Nature 310,23,699 '84)。

なおカルディオデイルチンのDNA配列は、
 その分子量7,500から推定されるアミノ酸の
 数が72~75であり、かつ生体内でプロセッ
 シングされやすいアルギニンの位置から推定し
 た。

上記ヒト由来のカルディオデイルチンは、上
 述のブタ由来のカルディオデイルチン(アナトミ
 ー アンド エンブリオロジー (Anatomy and
 Embryology) 168, 307-313, 1983)と比

明細書の浄書(内容に変更なし)

(図3)を得た。



上記プラスミドを制限酵素 Ava I で部分消化し(37℃、30分)、停止コドンを含む上記したリンカー(ターミネーションリンカー)をT4 DNAポリメラーゼ存在下で連結させプラスミド pUCod5 term を得た(図4)。

さらに、Tac プロモータを有するプラスミド pDR540 を制限酵素 EcoR I、BamH I で消化し(37℃、2時間)、約370 bp フラグメントを得る(図5)。一方、上記プラスミド pUCod5 term を Apa I、BamH I で消化し(37℃、2時間)、260 bp フラグメントを得た(図5)。

一方 pHANF48 を Apa I、EcoR I で消化し、アンピシリン耐性遺伝子を含有する大きいフラグメントを得た(図5)。

このようにして得た三つのフラグメントをT4 DNAリカーゼで連結した後(37℃、14時間)、得られたプラスミドで大腸菌 JM105 を形質転換し、形質転換株よりプラスミド p_hAVD (図6)を得た。

130 bp)。(図7)

得られた pSP64-OmpF 底33 を Pst I で消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑化させ、Hpa I リンカーを結合し、その後 Hpa I で消化し、リガーゼで閉環しプラスミド pSP64-OmpF-Hpa I を得た。(図8)

<プラスミド pUC-OmpFS + Met の構築>

- (1) プラスミド pUC8 を EcoR I、ついで Hind III で消化し Ampr の遺伝子をもつ EcoR I - Hind III 断片を得た。
- (2) プラスミド pSP64-OmpF-Hpa I を EcoR I、ついで Hind III で消化し、約200 bp の断片を得た。さらに Hha I で消化し、OmpFシグナルペプチド領域を含む85 bp の断片を得た。

上記(1)、(2)で得られた2つの断片と合成リンカー



とをT4 DNAリガーゼにより連結し、プラス

参考例2

プラスミド pHP006 (Nucleic Acid Research 10, 6957 (1982)) を制限酵素 Pst I で消化し178 bp の Pst I 断片を得た。一方、プラスミド pSP64 (ベ-リッガー マンハイム社製) を制限酵素 Pst I で消化し、ついでアルカリホスファターゼで処理した後、上記 Pst I 断片と結合させ、プラスミド pSP64-OmpF を得た。(図7)

このプラスミド pSP64-OmpF を制限酵素 Hind III で消化し、Bal 31 で消化した後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化した。次に Hind III リンカーを連結し、さらに Hind III で消化し、その後リガーゼで閉環させた。

ついで、このプラスミドで大腸菌を形質転換させ、得られる形質転換株からプラスミド DNA を分離した。

このプラスミドを Hind III、Pst I で消化し、150 bp より小さい断片を選択しクロン底33を選んだ。(Pst I - Hind III 消化断片は

ミド pUC-OmpF-S + Met を得た。(図8)

<プラスミド p_hMAVD の構築>

プラスミド pUC-OmpF-S + Met を Hind III FauD II で消化し、OmpFシグナルペプチド領域を含む約70 bp の断片を得た。

一方参考例1で得られた pHANF48 を Alu I で消化し、AVD遺伝子領域を含む269 bp の断片を得、さらに Apa I で消化し、約220 bp の断片を得た。この両断片を連結し、これをさらに、参考例で得られたプラスミド p_hAVD を Hind III、Apa I で消化して得られた大きい方の断片とT4 DNAリガーゼにより連結し、プラスミド p_hAVD-ΔST を得た(図9)

得られたプラスミドを Ava I で消化して得られる大きい方の断片と、プラスミド p_hAVD を Ava I で消化して得られる小さい方の断片とをT4 DNAリガーゼにより連結し、プラスミド p_hMAVD-ΔP を得た。(図9)

これを Hind III で消化し、BAP処理したプラスミドに p_hAVD を Hind III で消化して得た

104bpのlacプロモーターを挿入し、プラスミドp_hMAVDを得る。(図9)

これをEcoRIで消化し、BAP処理し、一方プラスミドpMC9をEcoRIで消化し、lacI遺伝子を含む1.7kbpの断片を得、両者を結合してプラスミドp_hMAVD-lacIを得た。(図10)実施例1

<プラスミドp_hMANFの構築>

参考例1で得られたプラスミドp_hANF48を制限酵素AatIで消化し、ついでAvaIで消化し、BAP処理して大きい断片を得た。

一方、上記プラスミドp_hMAVD-lacIをAatI、AvaIで消化し、OmpA-AVD遺伝子を含む断片を得た。

この両断片をリガーゼで連結し、プラスミドp_hMANFを得た。(図11)

<ペプチドの産生>

プラスミドp_hMANFで形質転換した大腸菌Y₁をレーブロス中で培養(37℃、3時間)した後インデューサーとして2mMITG

(イソプロピルチオガラクトサイド)を加え、さらに4時間培養し、集菌した。これを浸透圧ショック処理し、ペリプラズム画分を抽出した。SDS-PAGEで分子量約21,000の移動度に相当するバンドを抽出し、HPLCに付し、そのアミノ酸配列を決定したところ、式(I)で示される配列であつた。

(発明の効果)

本発明に係るペプチドは、血管弛緩作用(血圧降下作用)を有する。

* 図面の簡単な説明

図1、4、5、7、8、9、10及び11は、本発明において用いられるプラスミドの製造工程例の概略図であり、図2は、図1における365bpフラグメントの制限酵素切断地図を示し、図3はプラスミドpUCcd8の切断地図を示し、図6は、プラスミドp_hAVDの切断地図を示す。

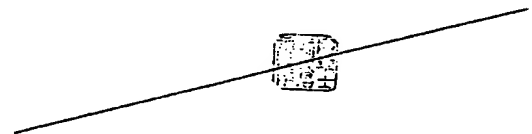


図2

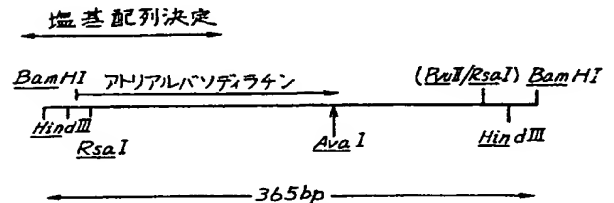
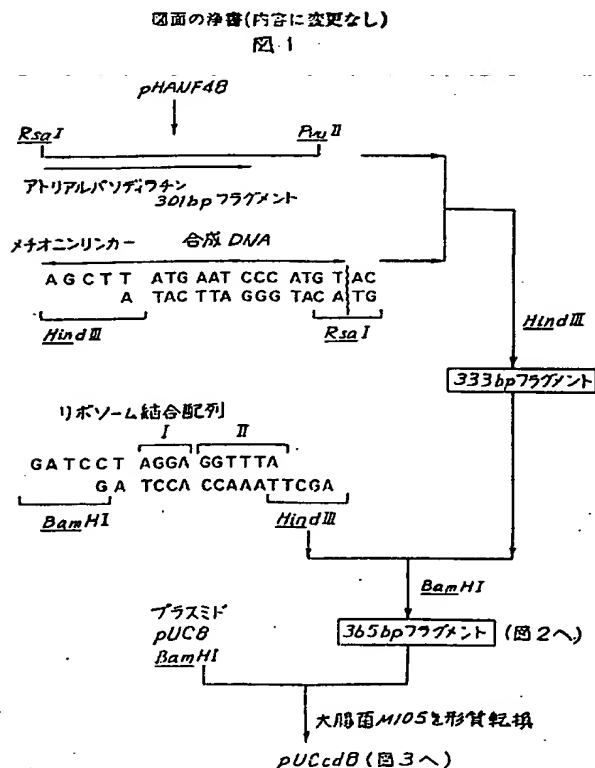


図3

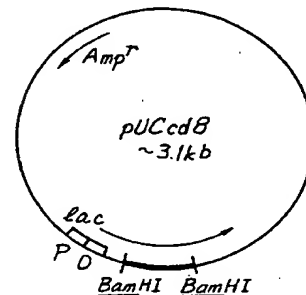


图 4

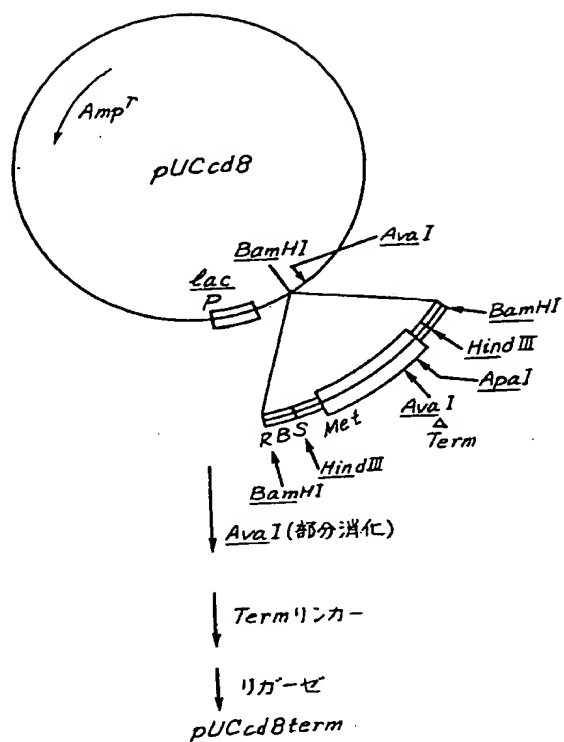


图 5

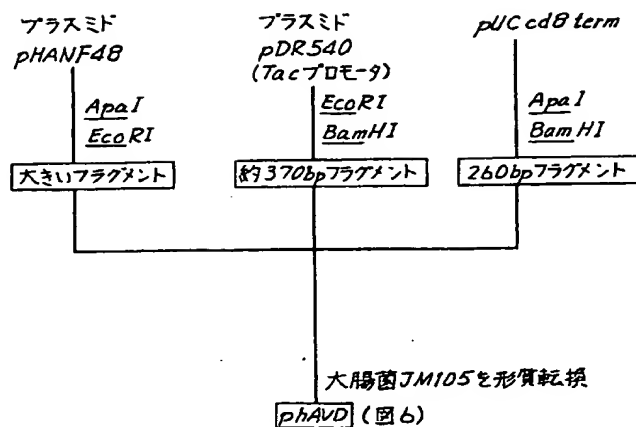
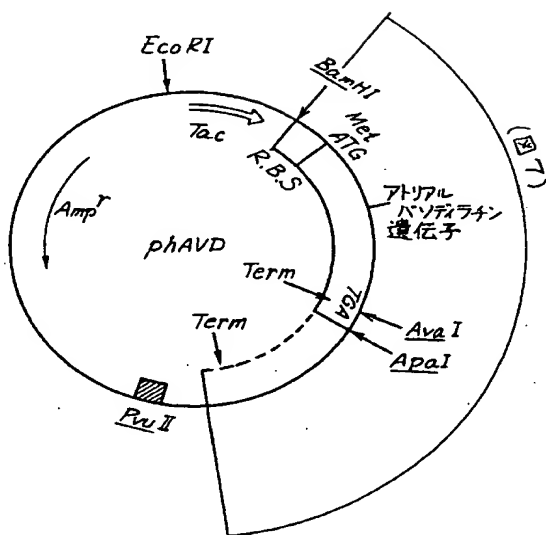


图 6



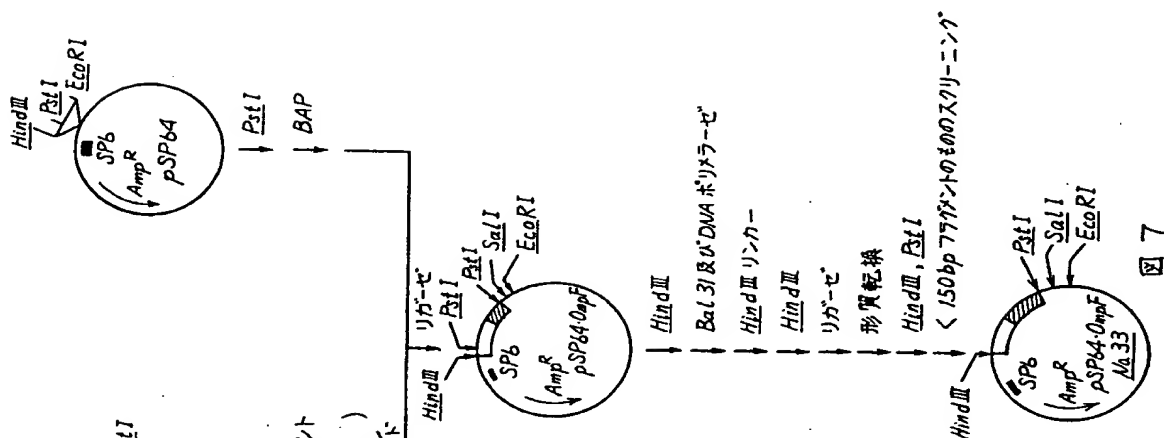


図 7

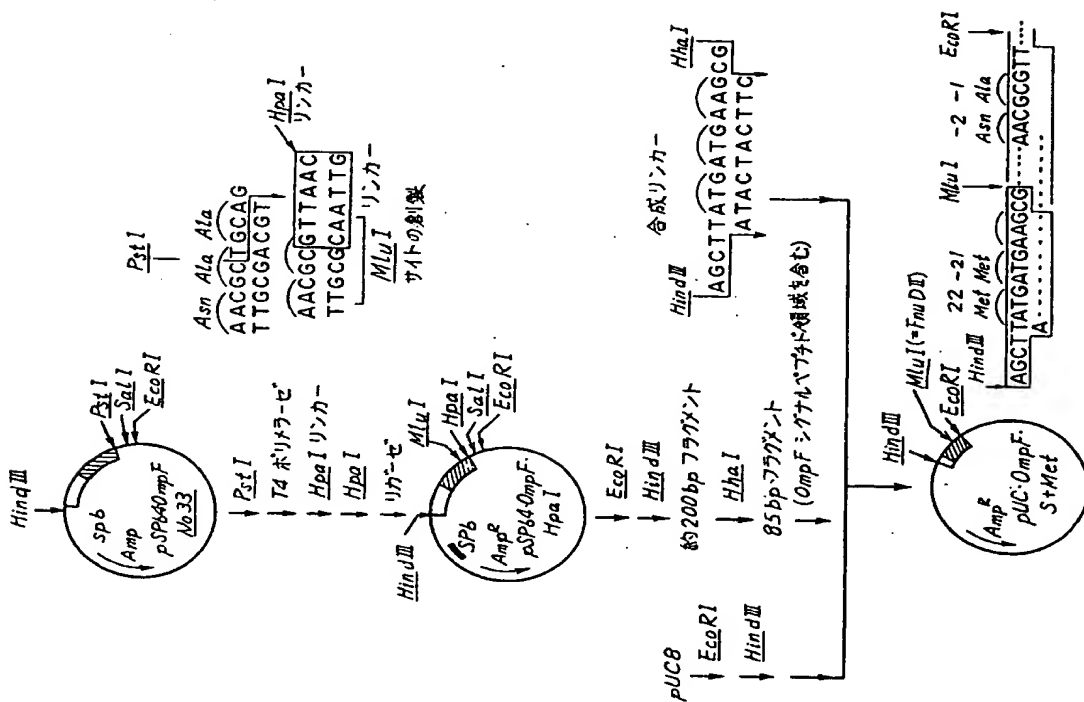


図 8

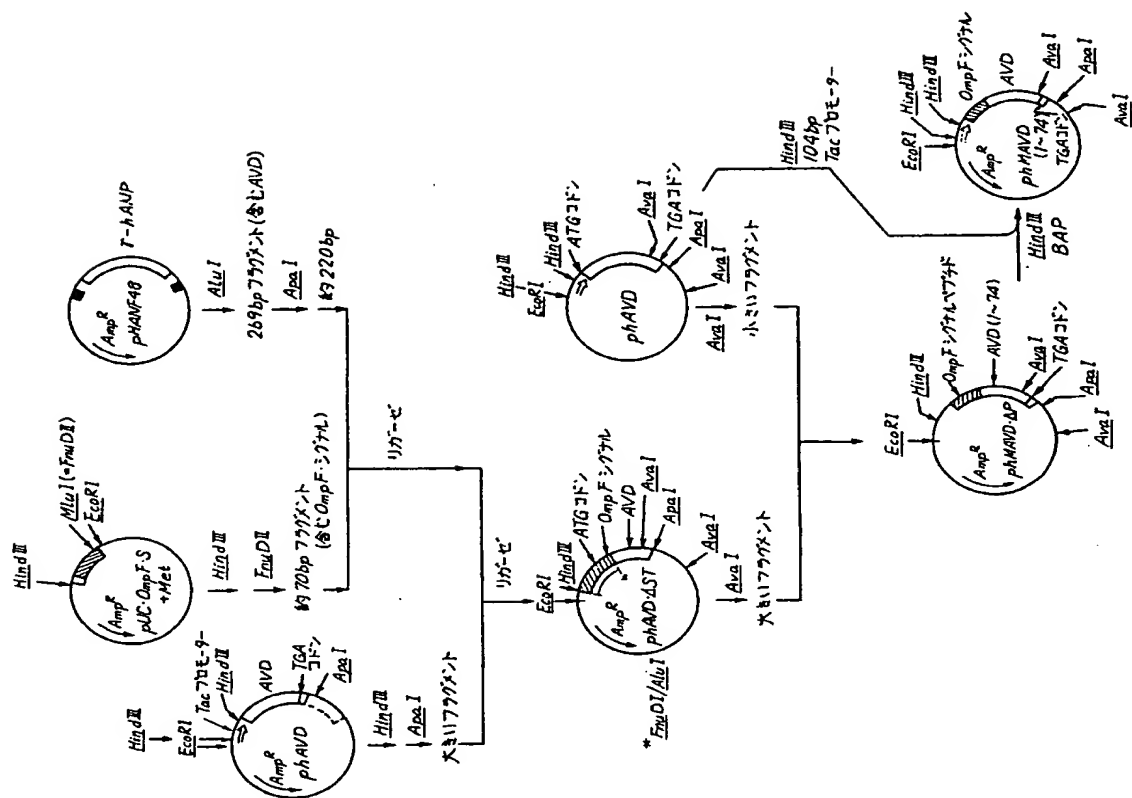


図 9

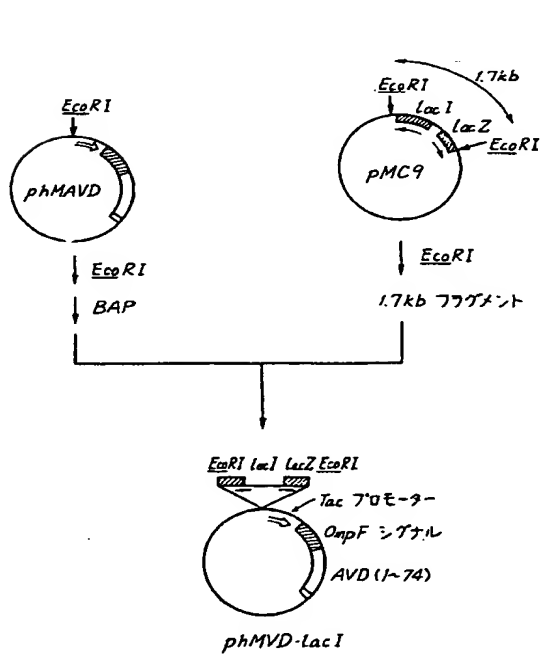


図 10

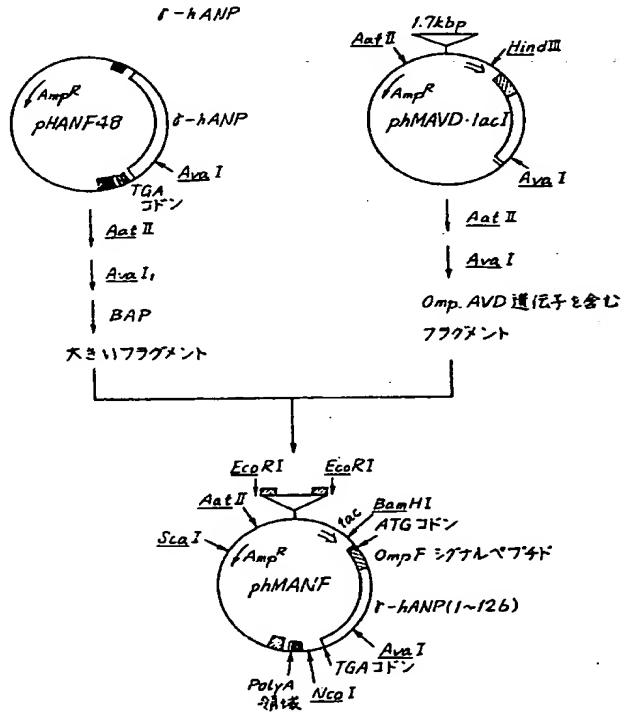


図 11

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁴
 C 12 P 21/02
 //(C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号
 6712-4B

⑫発明者 寺 西 豊 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
 会社総合研究所内
 ⑬発明者 中 西 重 忠 京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116

手続補正書 (方式)

昭和61年12月/2日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和61年特許願第220835号

2 発明の名称

ペプチド

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(596)三菱化成工業株式会社

4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

5 補正命令の日付 昭和61年11月25日(発送日)

6 補正の対象 明細書及び図面

7 補正の内容 明細書の4~7頁、13~16頁、19、

20頁と図1を別紙の通り差し替える。

(4~7頁4~7頁、13~16頁
 13~16頁、19頁、20頁
 20~20頁へ)

手続補正書 (自発)

昭和61年12月/2日

特許庁長官殿

1 事件の表示 昭和61年 特 許 願第220835号

2 発 明 の 名 称

ペプチド

3 補正をする者

出願人 (596) 三菱化成工業株式会社

4 代 理 人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

5 補正の対象 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6 補正の内容

方式 場

(1) 明細書第7頁第4行に「Nature」とあるを

「ネイチャー (Nature)」と訂正する

(2) 同書同頁第12行及び最下行に「

特許庁長官殿

- Biochemicals」とあるを「ビーエルバイオケミカルズ(P.L. Biochemicals)」と訂正する。
- (3) 同書第10頁第7行に「Nucleic Acid Research」とあるを「ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acid Research)」と訂正する。
- (4) 同書同頁第11行に「Boehringer Mannheim社」とあるを「ベーリンガーマンハイム(Boehringer Mannheim)社」と訂正する。
- (5) 同書第13頁第7行に「New England Biolabs」とあるを「ニューイングランドバイオラブズ(New England Biolabs)」と訂正する。
- (6) 同書第17頁第11行に「Nature」とあるを「ネイチャー(Nature)」と訂正する。
- (7) 同書第22頁第2行に「Nucleic Acid Research」とあるを「ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acid Research)」と訂正する。

以上

1 事件の表示

昭和61年特許願第220835号

2 発明の名称

ペプチド

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(596) 三菱化成工業株式会社

4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

電(283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川 一

(ほか1名)

5 補正の対象

図面

6 補正の内容

図5、6を別紙の通り差し替える。

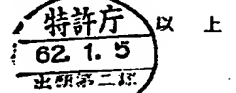


図5

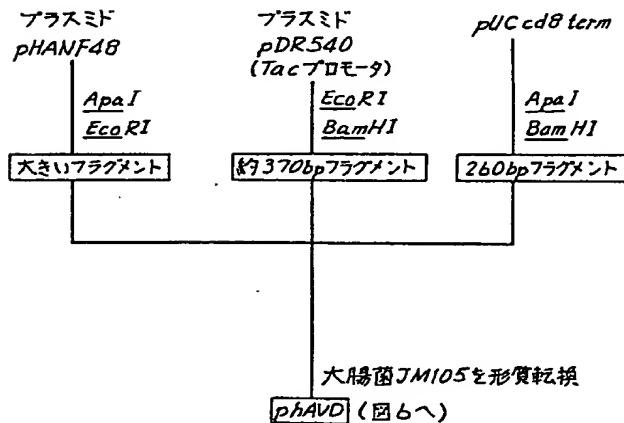


図6

